한국생물공학회지 제 14권 제 1호
*Korean J. Biotechnol. Bioeng.*
Vol. 14, No 1, 103-108(1999)

# Fibrin 용해 균주의 분리 및 특성

†정 용 준
전주대학교 이공대학 생명과학부
(접수 : 1998 11. 25., 게재승인 : 1999. 1. 26.)

# Isolation and Characterization of a Bacterium with a Fibrinolytic Activity

Yong-Joon Chung†
*School of Life Science, College of Science & Technology, Jeonju Univ*
(Received : 1998. 11. 25., Accepted : 1999 1. 26.)

A bacterium having strong fibrinolytic activity, S7-16 strain, was isolated from soil. The isolated bacterium was identified and named as *Bacillus* sp. S7-16. The optimal composition of the medium for the production of fibrinolytic enzyme by *Bacillus* sp. S7-16 was 0.5%(w/v) polypeptone, 0.5%(w/v) yeast extract, 0.3%(w/v) NaCl, 0.1% (w/v) $KH_2PO_4$, 0.3%(w/v) $K_2HPO_4$, and 0.01%(w/v) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. The optimal temperature and initial pH of the medium for the production of the enzyme were 35℃ and 7.0, respectively. The maximum production of the fibrinolytic enzyme was obtained after 24 hours of the incubation. Under the above conditions, the culture supernatant had strong fibrinolytic activity, but almost no caseinolytic activity. Within pH4~11, the crude fibrinolytic enzyme was stable. The enzyme was stable up to 50℃. The optimum pH and temperature for the enzyme activity were around 7.5 and 40℃, respectively.

Key words : fibrinolytic activity, *Bacillus* sp., no caseinolytic activity

## 서 론

최근 우리 나라에서는 국민소득의 향상과 식생활의 변화로 인하여 혈액순환 장애에 따른 심장질환과 같은 성인병의 발병율이 높아지고 있으며, 사망률도 높은 비중을 차지하고 있다. 혈액순환계 질환의 많은 원인 중 대표적인 것으로 혈전을 들 수 있는데, 혈전은 상처복구시 지혈과정에서 중요한 역할을 담당하고 있으나 혈관내에 생성된 혈전은 혈관벽에 점착하거나 미세혈관을 막아 정상적인 혈류를 방해하게 되어 혈액순환계 질환을 초래하게 된다

혈액순환계 질환의 예방 및 치료에 이용되는 혈전용해효소는 혈전성분인 fibrin을 분해한다. 혈전 용해작용은 혈전 용해효소의 직접적인 용해작용과 plasminogen 활성인자에 의해 plasmin을 활성화 시켜 혈전을 용해하는 간접적인 용해작용이 있다.

지금까지 보고된 plasminogen 활성인자 및 혈전 용해효소로 뱀(*Agkistrodin contortix contortix*)의 독액에서 분리한 fibrolase(1), 지렁이(*Lumbricus rubellus*)에서 분리한 6개의 단백질(Lumbrikinase)(2, 3), *Fuzarium oxysporum*이 생산하는 두 종의 단백질(4), *Bacillus subtilis*의 fibrin 용해효소(5, 6), 일본 대두 발효식품인 natto에서 분리한 nattokinase(7), 한국의 청국장에서 분리한 *Bacillus* sp.가 생산하는 fibrin 용해효소(8) 등이 보고되었다. 현재, 혈전증의 치료에 널리 사용되는 것으로 urokinase(7, 9, 10), streptokinase(11, 12), tPA(tissue type plasminogen activator)(13) 등이 있으나 가격이 높고, 출혈작용 등의 부작용과 urokinase를 제외하고는 경구투여가 불가능하다는 단점을 지니고 있다. 또한, 혈전용해제의 대부분이 일종의 단백질 분해효소이기 때문에 기질에 대한 특이성은 물론 장내 흡수성 및 체내에서의 면역반응 유발여부 등이 부작용을 줄일 수 있는 필수조건이라고 사료된다

따라서 본 연구에서는 혈전 용해시 부작용을 최소화하기 위한 조건으로서 fibrin에 대한 기질특이성이 우수한 효소를 생산하는 균주를 분리할 목적으로 자연계로부터 활성미생물을 분리선발하였으며, 선발된 균주를 동정하고 효소생산조건 및 조효소의 특성을 조사함으로써 새로운 혈전 용해 의약품 효소로서의 응용가능성을 타진하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시 료

균주 분리를 위한 시료는 전북지역내 각지에서 토양을 채취하고, 장류(된장, 청국장, 고추장, 간장)는 전북지역 가정에서 직접 담근 것과 시판되고 있는 제품을 구입하여 저온보관하며 실험에 사용하였다. Fibrin 및 casein은 Sigma사의 제품을 구입하여 사용하였으며, 그 외의 시약은 Difco사 및 특급시약을 사용하였다.

† Corresponding Author : School of Life Science, Jeonju University, Hyoja-dong, Wansan-gu, Chonju, Chonbuk 560-759, Korea
Tel : 0652-220-2560, Fax : 0652-220-2341
e-mail : chungyj@www.jeonju.ac.kr

### 균주의 분리

각 시료를 0.85%(w/v) 생리식염수로 현탁·희석한 후 nutrient agar 배지(0.3%(w/v) beef extract, 0.5%(w/v) bacto peptone, 1.5%(w/v) agar)에 도말하고 30℃에서 24~48시간 배양하여 단일 균락을 분리하였다. 생육된 colony들 중 형태, 색깔 등 외관상 상이한 균주들을 순수분리하여 사면배양한 후 저온에 보관하면서 fibrin 용해활성의 검색에 이용하였다.

### Fibrin 용해활성 미생물의 선별

김(8)등의 방법에 따라 제조한 0.2%(w/v) fibrin이 함유된 nurient agar 배지 평판위에 순수분리된 각 균주들을 접종하여 30℃에서 24시간 배양한 후 30% (w/v) trichloroacetic acid를 부가하여 colony 주위의 투명환이 형성되는 균주를 활성균주로 1차 선별하였다.

### Fibrin 용해활성 측정법

Fibrin 평판(0.2%(w/v) fibrin, 0.8%(w/v) agar, 20 mM 인산완충용액, pH7.8)을 제조하여 1차 선별된 각 균주의 배양상등액 20 μL를 paperdisc 상에 흡수시켜 얹어 놓고 30℃에서 18시간 반응시킨 후 30% (w/v) trichloroacetic acid를 부가하여 나타나는 투명환의 직경을 측정하므로써 fibrin 용해활성을 조사하였다 이때 효소 1 unit는 위의 반응조건에서 10 ㎜의 투명환을 생성시키는 효소량으로 하였다

### 단백질 용해활성 측정법

Casein 평판(1%(w/v) casein, 0.8%(w/v) agar, 20 mM 인산완충용액, pH7.8)을 제조하여 1차 선별된 균주의 배양상등액 20 μL를 paperdisc 상에 흡수시켜 얹어 놓고 30℃에서 18시간 반응시킨 후 30%(w/v) trichloroacetic acid를 부가하여 나타나는 투명환의 직경을 측정하므로써 단백질 분해활성을 조사하였다. 이때 효소 1 unit는 위의 반응조건에서 10 ㎜의 투명환을 생성시키는 효소량으로 하였다

### 균주의 동정

선발 미생물에 대한 현미경 관찰을 통한 형태학적 특징과 생리적 및 생화학적 특성을 조사하고 이들 결과를 토대로 Bergey's mannual of systematic bacteriology(14)에 준하여 동정하였다.

### Fibrin 용해효소 생산을 위한 조건의 검토

탄소원, 질소원, 배양 초기pH 및 배양온도 등을 달리한 효소생산 기본배지(Table 1)에 종배양을1% (v/v) 수준으로 접종하여 30℃에서 24시간, 180 rpm으로 회전진탕배양한 후 원심분리하여 얻은 상등액의 fibrin 및 단백질 분해활성 측정법에 따라 효소활성을 측정하였다.

### 조효소액의 조제

효소생산 배지에 종배양을 1%(v/v) 수준으로 접종하여 35℃에서 24시간 180 rpm으로 회전진탕배양한 후 원심분리하여 배양상등액을 얻었다. 얻어진 배양상등액에 ammonium sulfate를 20~60%(w/v)로 포화시킨 다음 4시간 동안 방치하였다. 이 시료를 원심분리한 후 침전물을 20 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 7.0)에 용해시킨 다음 동일 완충용액으로 투석하여 조효소액을 조제한 후 조효소의 특성을 검토하였다

Table 1. Composition of the basic medium used in the fibrinolytic enzyme production.

| Composition of medium(g per liter of D.W.) | |
|---|---|
| polypeptone | 5 |
| Yeast extract | 3 |
| NaCl | 3 |
| $KH_2PO_4$ | 1 |
| $K_2HPO_4$ | 3 |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.1 |
| | pH 7.0 |

## 결과 및 고찰

### 활성미생물의 선발 및 동정

장류 및 토양으로부터 시료를 취하여 평판희석배양법에 의하여 nutrient agar 배지에 도말하고 30℃에서 24~48시간 배양한 다음 외관상 형태가 상이한 단일균락을 분리하였다. 그 결과 장류에서는 100여 주의 균주를, 토양에서는 200여 주의 균주를 분리하였다. 분리된 300여 주의 균주를 0.2%(w/v) fibrin이 함유된 nutrient agar plate와 1%(w/v) casein이 함유된 nutrient agar plate에 각각 집종한 다음 30℃에서 24~48시간 배양한 후 fibrin 용해활성은 크고 casein 분해활성은 낮은 12주의 균주를 1차 분리하였다.

1차 분리된 12주의 균주를 효소생산 기본배지(Table 1)에 한 백금이씩 집종한 다음 30℃에서 회전진탕배양하면서 12시간 간격으로 배양상등액을 얻은 후 fibrin 및 단백질 분해활성 측정법에 따라 효소활성을 측정하였다(Table 2) 그 결과 K2-10 균주가 가장 높은 *fibrin* 용해활성을 보였으며 *casein*에 대한 분해활성도 높았다. 한편, C3-8과 S7-16 균주는 24시간 배양시 fibrin 용해활성을 가지면서 다른 균주들에 비해 casein에 대한 분해활성은 거의 나타나지 않았다. 따라서 두 균주는 fibrin에 대한 기질특이성이 좋은 것으로 사료되며, 두 균주 중 S7-16균주가 fibrin에 대한 용해활성이 높은 것으로 나타나 fibrin 용해활성 미생물로 선발하였다. 그러나 몇몇 균주의 경우 배양시간에 따른 fibrin과 casein의 분해활성에 비례적 관계를 나타내지 않는데, 이는 2종 이상의 fibrin 및 단백질 용해효소를 생산하는 것으로 생각된다.

선발된 S7-16 균주의 동정을 위해 현미경 관찰을 통한 형태학적 관찰과 생리 및 생화학적 특성을 조사한 결과(Table 3). 그람 양성의 간균이며 운동성이 있고, 호기성이며 포자를 형성하는 것으로 관찰되었다. Table 3의 결과를 바탕으로 S7-16 균주를 Bergey's manual of systematic bacteriology(12)에 준하여 검토하였을 때 *Bacillus* sp 로 동정하였고, *Bacillus* sp. S7-16으로 명명하였다

### 탄소원의 영향

Fibrin 용해효소의 생산에 미치는 탄소원의 영향을 조사하기 위하여 glucose, fructose, lactose, maltose, galactose, sucrose, soluble starch, glycerol, sodium citrate 등을 탄소원으로

Table 2 Time course of the enzyme activity of the selected strains.

| Strains | Relative caseinolytic activity(%)* | | | | Relative fibrinolytic activity(%)** | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 12hrs | 24hrs | 36hrs | 48hrs | 12hrs | 24hrs | 36hrs | 48hrs |
| C2-4 | 30 | 21 | 21 | 13 | 67 | 83 | 60 | 53 |
| C3-1 | 41 | 41 | 25 | 25 | 53 | 60 | 25 | 25 |
| C3-3 | 35 | 35 | 21 | 21 | 74 | 74 | 47 | 47 |
| C3-8 | 0 | 0 | 17 | 17 | 30 | 53 | 53 | 60 |
| D2-11 | 35 | 35 | 30 | 13 | 83 | 91 | 91 | 60 |
| D4-8 | 25 | 41 | 41 | 10 | 53 | 74 | 83 | 35 |
| D4-9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 21 | 13 | 0 |
| K2-7 | 30 | 30 | 13 | 0 | 83 | 91 | 67 | 10 |
| K2-10 | 41 | 41 | 41 | 21 | 67 | 83 | 100 | 83 |
| K2-11 | 25 | 21 | 21 | 21 | 74 | 83 | 74 | 74 |
| S7-16 | 0 | 0 | 10 | 13 | 47 | 67 | 67 | 30 |
| S8-44 | 30 | 35 | 30 | 30 | 53 | 67 | 67 | 67 |

* (clear zone size of each strain on the casein plate/clear zon size of K2-10(after 36hrs) on the fibrin plate)×100

** (clear zone size of each strain on the fibrin plate/clear zon size of K2-10(after 36hrs) on the fibrin plate)×100

Table 3. Morphological and biochemical characteristics of S7-16

| | |
|---|---|
| Morphological characteristics | |
| Form | rod |
| Motility | + |
| Gram stain | + |
| Spores formation | + |
| Biohemical characteristics | |
| Starch hydrolysis | ± |
| Skim milk hydrolysis | ± |
| *Gelatin hydrolysis* | + |
| Catalase | + |
| Oxidase | + |
| Methyl red reaction | - |
| VP reaction | + |
| Tryptophan utilization | - |
| Citrate utilization | + |
| Urease | - |

+ : positive, - : negative, ± : not detectable

1%(w/v)으로 첨가하여 효소생산성을 측정한 결과, fibrin용해효소의 상대활성도는 탄소원을 첨가하지 않은 대조구가 가장 높은 활성을 나타내어 탄소원은 균체생육에는 효과적이었지만 효소생산성에는 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다(data not shown)

**질소원의 영향**

각종 질소원의 영향에 대한 결과는 Table 4와 같다. 실험결과 질소원의 영향에 대한 fibrin 용해활성의 상대생산성은 polypeptone을 첨가하였을 때에 가장 높게 측정되었고, 0.5%(w/v) 농도의 polypeptone에서 가장 높은 효소생산성을 나타내었다(Figure 1)

Table 4. Effect of nitrogen sources on the fibrinolytic enzyme production.

| *Nitrogen sources** | Growth (O.D. at 660nm) | RCA(%)** | RFA(%)*** |
|---|---|---|---|
| Beef extract | 4.9 | 0 | 124 |
| Bactopeptone | 0.8 | 0 | 52 |
| Csaein | 3.9 | 0 | 100 |
| Polypeptone | 2.2 | 0 | 178 |
| Tryptone | 2.6 | 0 | 70 |
| $NaNO_3$ | 1.0 | 0 | 79 |
| $NH_4NO_3$ | 0.8 | 0 | 163 |
| $NH_4H_2PO_4$ | 0.5 | 0 | 70 |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 0.9 | 0 | 89 |
| Control**** | 1.6 | 0 | 100 |

Growth and enzyme activity were determined after incubation for 24hrs.

* added to a control at 0.5%(W/V), repectively

** relative caseinolytic activity

*** relative fibrinolytic activity

**** not contained polypeptone

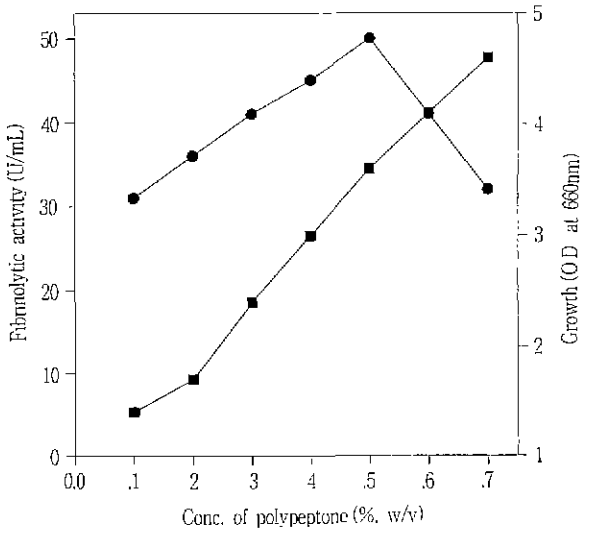


Figure 1. Effect of polypeptone on the fibrinolytic enzyme production.

### Yeast extract의 영향

Yeast extract의 농도가 효소생산성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 기본배지에 0.1~0.8% (w/v) yeast extract를 첨가해 효소생산성을 조사하였다.

실험결과 0.5%(w/v) yeast extract에서 최대의 효소생산성을 나타내었다(Figure 2).

### 배양 초기pH의 영향

효소 생산성에 미치는 초기 pH의 영향에 대한 실험결과, 초기 pH가 중성 범위(pH 7.0)에서 가장 높은 상대효소생산성을 나타내었다(Figure 3).

### 배양온도의 영향

배양온도에 따른 효소생산성 측정은 25~40℃ 범위에서 실험

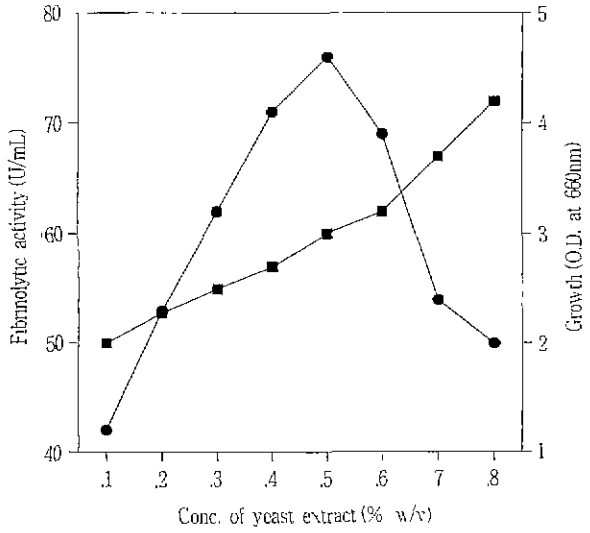


Figure 2. Effect of yeast extract on the fibrinolytic enzyme production.

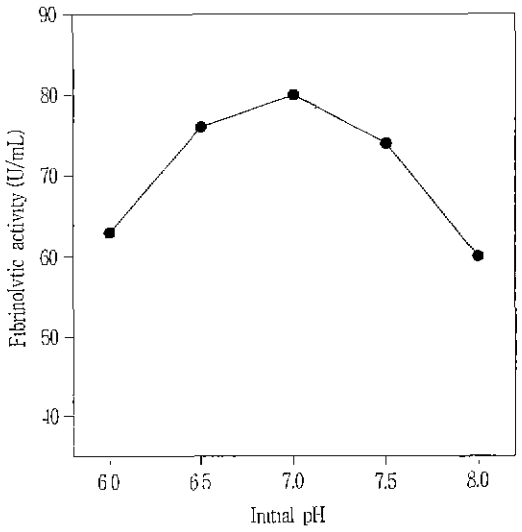


Figure 3. Effect of initial pH on the fibrinolytic enzyme production.

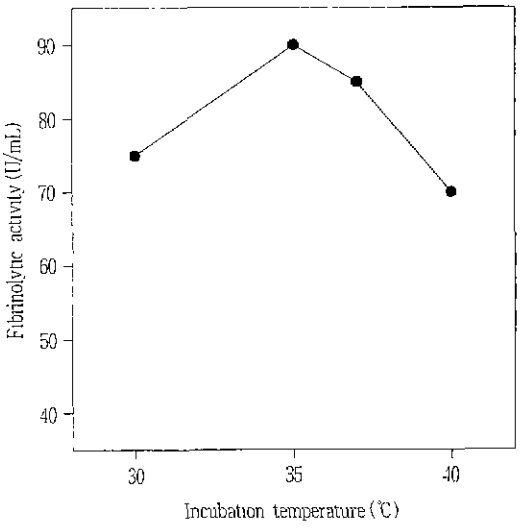


Figure 4. Effect of incubation temperature on the fibrinolytic enzyme production.

하였다. 실험결과, 35℃에서의 배양시 최대의 상대효소생산성을 나타내었다(Figure 4).

Fibrin 용해효소의 효율적인 생산을 위한 효소생산 조건을 검토한 결과, 0.5% (w/v) polypeptone, 0.5%(w/v) yeast extract, 0.3%(w/v) NaCl, 0.1% (w/v) $KH_2PO_4$, 0.3%(w/v) $K_2HPO_4$, 0.01%(w/v) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$(pH7.0)의 배지조성하에서 35℃에서 180 rpm으로 24시간 회전진탕배양하였을 때 fibrin 용해효소 생산이 최대를 보였다. 탄소원은 균체생육에는 효율적이었으나 효소생산에는 영향을 미치지 못하였으며, polypeptone과 yeast extract의 혼합 배양시 상대효소생산성이 증가하였다. 한편, *Fuzarium oxysporum* N.R.C 1.(1)의 혈전 용해효소 생산의 경우, peptone과 yeast extract를, *Streptococcus* sp. ATCC 12449(15)의 streptokinase의 생산에 casamino acid와 yeast extract의 혼합 배양시 효소생산성이 최대였다고 보고하였다.

**배양시간에 따른 효소생산성의 변화**

효소생산 배지에 종배양액을 1%(v/v) 접종하여 35℃에서 180 rpm으로 회전진탕배양하면서 배양시간에 따른 효소생산성의 변화를 조사하였다. 그 결과(Figure 5), 27시간부터 casein 용해활성이 나타났으며, fibrin 용해활성은 24시간부터 최대의 상대활성을 나타내었다 따라서 효소생산은 24시간에서 최적의 결과를 나타내었다.

**조효소의 활성에 미치는 온도의 영향**

조효소활성의 최적온도를 알아보기 위하여 25~ 50℃까지 각 온도별로 효소활성을 측정한 결과, 40℃에서 최고의 활성을 나타내었다(Figure 6)

**조효소의 열안정성**

조효소의 열안정성을 알아 보기 위하여 조효소액을 40~80℃에서 10분간 처리한 다음 40℃에서 18시간 반응시켜 fibrin 용해효소 활성 측정법에 따라 상대활성을 측정하였다 그 결과 50℃까지는 조효소액의 활성이 100% 유지되었다(Figure 7). 온도에 대한 안정성은 nattokinase(14)와 같은 결과를 보였으며, 지렁이에서 분리된 혈전 용해효소(3)보다는 낮은 결과를 나타내었다

**조효소의 활성에 미치는 pH의 영향**

조효소활성의 최적pH를 알아보기 위하여 pH6~11까지 각 pH별로 효소활성을 측정한 결과, pH7.4~7.8에서 최고의 활성을 나타내었다(Figure 8). 이는 *Bacillus subtilis*(6)의 혈전용해 효소와 최적 pH에 있어서 유사함을 보여주었다

**조효소의 pH에 대한 안정성**

조효소액을 pH3~11에서 10분간 처리한 다음 40℃에서 18시간 반응시켜 fibrin 용해효소 활성 측정법에 따라 상대활성을 측정하였다. 그 결과, pH4~11의 범위에서 안정하였다(Figure 9). 이 결과는 지렁이에서 분리된 혈전 용해효소(pH1~12)(3)보다는 안정성이 낮지만, nattokinase(pH7~12)(7)보다는 산성조건에서 안정함을 보였다. 특히, urokinase, 지렁이에서 분리된 혈전 용해효소,

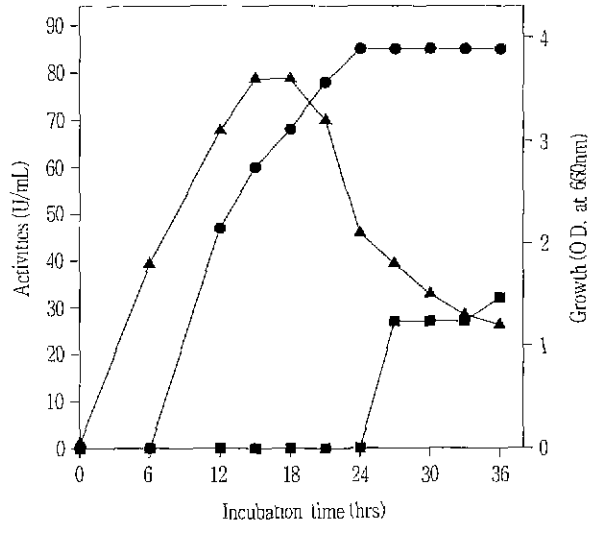


Figure 5. Time course of enzyme production.

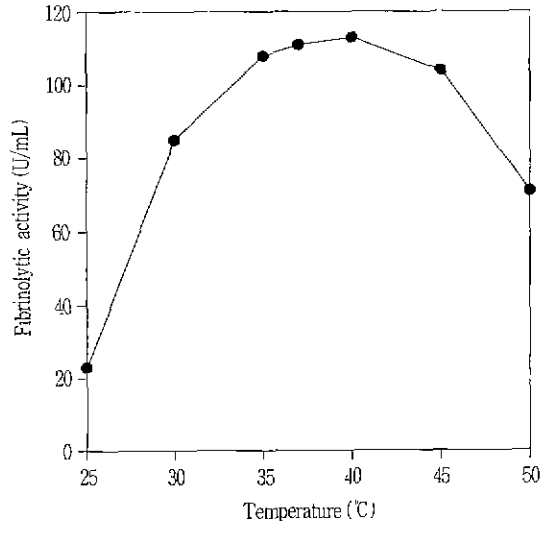


Figure 6. Effect of temperature on the fibrinolytic enzyme activity.

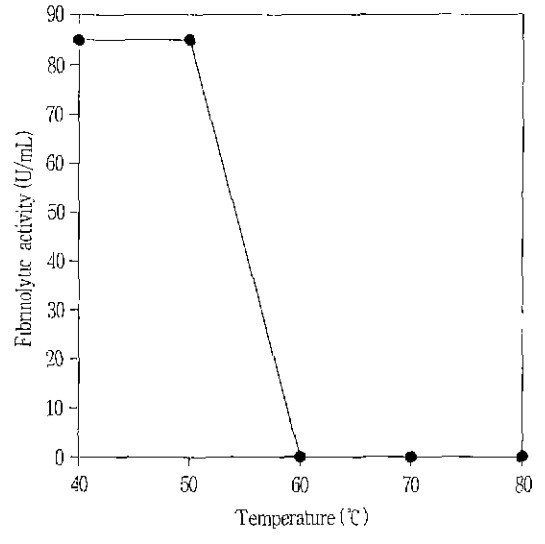


Figure 7. Effect of temperature on the fibrinolytic enzyme stability.

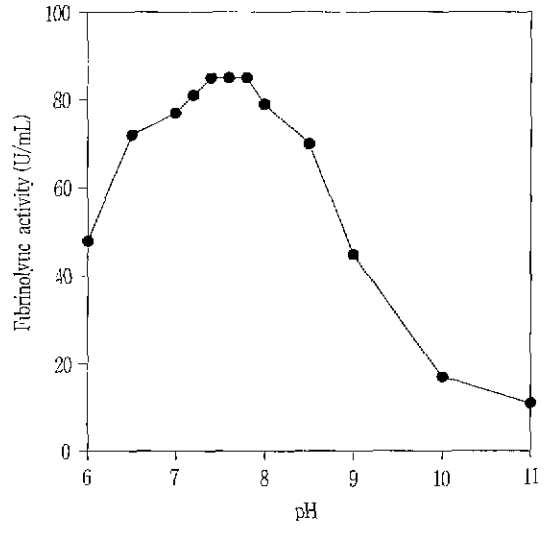


Figure 8. Effect of pH on the fibrinolytic enzyme activity.

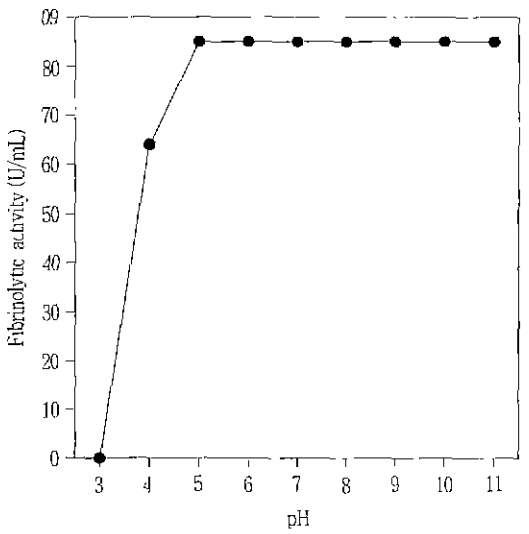


Figure 9 Effect of pH on the fibrinolytic enzyme stability

nattokinase 등의 경우, 경구투여시 체내에서의 혈전 용해를 증가할 수 있다고 보고되어 있어(9, 15, 16) 본 연구에서 얻어진 조효소액의 pH에 대한 안정성은 매우 유용하다고 사료된다.

## 요 약

혈전 용해효소를 생산하는 미생물을 탐색하기 위하여 장류 및 토양시료로부터 미생물을 분리하여 그 중 fibrin 용해활성이 높고 기질특이성이 우수한 S7-16 균주를 선발하였다. 선발된 미생물은 Gram 양성의 간균으로 운동성이 있고, catalase 양성이었으며 포자를 형성하는 것으로 관찰되어 *Bacillus* sp. S7-16으로 명명하였다. *Bacillus* sp S7-16의 효소생산 조건을 검토한 결과, 0.5% (w/v) polypeptone, 0.5% (w/v) yeast extract, 0.3% (w/v) NaCl, 0.1%(w/v) $KH_2PO_4$, 0.3% (w/v) $K_2HPO_4$, 0.01% (w/v) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (pH7.0)의 배지조성하에서 35℃에서 180 rpm으로 24시간 회전진탕배양하였을 때 fibrin 용해효소 생산이 최대를 보였으며, 이때 casein 용해활성은 나타나지 않았다. Fibrin 용해효소의 효소적 특성을 조사하기 위해 이 조건하에서 얻어진 배양상등액에 20~60% ammonium sulfate 분획침전을 행하여 조효소액을 조제하였으며, 얻어진 조효소액은 pH4~11의 범위에서 안정하였으며, 50℃까지 비교적 활성이 유지되는 열안정성을 보여주었다 조효소액의 최적 pH와 온도는 각각 7.5, 40℃부근에서 최적활성을 보였다

## 참 고 문 헌

1. Retzios, A. D. and Markland, F. S. Jr (1988), A direct-acting fibrinolytic enzyme from the venom of *Agkistrodon contortrix* effects on various components of the human blood coagulation and fibrinolisis systems, *Thromb. Res*, 52(6), 541.
2. Mihara, H., Sumi, H., Yoneta, T., Mizumoto, H., Ikeda, R., Seiki, M. and Maruyama, M. (1991), A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus rubellus*, *Japanese J. Phys.*, 41(3), 461.
3. Nakajima, N., Mihara, H., and Sumi, H. (1993), Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm, *Lumbricus rubellus*., *Biosci. Biotech. Biochiem*, 57(10), 1726.
4. Abdel-Fattah, A. F., Ismail, A. M. and Salch, S. A. (1993) Production and some properties of fibrinolytic enzymes from *Fusarium oxysporum* N.R.C 1., *Zentral. fur Mikrobiol.*, 148(2), 117.
5. Fayek, K. I. and El-Sayed, S. T. (1980), Fibrinolytic activity of an enzyme produced by *Bacillus subtilis*, *Zeit fur Ernahrung*, 19(1), 21.
6. Fayek, K. I and El-Sayed, S. T. (1980), Purification and properties of a fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis*, *Zeit fur Allgem Mikrobiol.*, 20(6), 375
7. Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H., Mihara, H., and Muraki, H. (1987), A nobel fibrinolytic enzyme(nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese Diet, *Experientia*, 43, 1110
8. 김용렉, 김원극, 오훈일. (1995), 청국장으로부터 혈전용해균주의 분리 및 동정, *Kor J Appl Microbiol. Biotechnol.*, 23(1), 1
9. Plug, J. and Kjeldgarrd, O. (1957), Urokinase an activator from human urine. I. Isolation and properties, *Biochem Biophys ACTA.*, 61, 424.
10. Toki, N., Sumi, H., Sasaki, K., Boreisha, I., and Robbins, K. C. (1985), Transport of urokinase across the intestinal tract of normal Uman Subjects with stimulation of synthesis and/or release of urokinase-type proteins., *J Clin. Ivest.*, 75, 1212.
11. Fletcher, A. P. and Johnson, A. J. (1957), Methods employed for purification of streptokinase, *Pro. Soc Exp. Biol. Med*, 94, 233.
12. Lijnen, H. R., van Hoef, and Coolen, D. (1992), Interaction of staphylokinase with different molecular forms of plasminogen, *Biochim Biophys. ACTA.*, 144, 1118.
13. Astrup, T. and Stermdorff, I. (1956), The plasminogen activator in animal tissue., *ACTA Physiol Scand.*, 36, 250.
14. Murray, R. G. E etal. (1986), Bergey's mannual of systematic bacteriology, vol. 2., Williams and Wilkins Press, Baltimore
15. 이인에, 이홍수, 성창근, 최인성, 민태익, 정태화, 최용정 (1996), Streptokinase의 생산에 관한 연구, 미생물과 산업, 22(2), 114.
16. Sumi, H., Seiki, M., Morimoto, N., Tshushima, H., Maruyama, M., and Mihara, H. (1985), Plasmid fibrinolysis atter intraduodenal administration of urokinase in rats., *Enzyme*, 33, 121.
17. Sumi, H., Sasaki, K., Toki, N., and Robbins, K. C. (1980), Oral administration of urokinase., *Thromb. Res*, 20, 711.